FREE soluble RANKL
High Sensitivity

(EN) 3rd Generation ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF FREE, SOLUBLE, UNCOMPLEXED HUMAN RANKL* IN SERUM OR HEPARIN PLASMA
CAT. NO. BI-20462 12 X 8 TESTS

(DE) 3. Generation ENZYM IMMUNOASSAY ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON FREIEM, NICHT KOMPLEXIERTEM, LÖSLICHEM HUMANEN RANKL* IN SERUM ODER HEPARIN PLASMA
KAT. NR. BI-20462 12 X 8 TESTE

(FR) DOSAGE IMMUNOENZYMATIQUE DU 3EME GENERATION POUR LA DETERMINATION QUANTITATIVE DE LIBRE, SOLUBLE HUMAIN RANKL* NON COMPLEXÉ DANS LE SERUM OU DANS LE PLASMA HEPARINE
REF. BI-20462 12 X 8 TESTS

(IT) IMMUNODOSAGGIO ENZIMATICO DI 3A GENERAZIONE PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEL RANKL* UMANO LIBERO SOLUBILE NON COMPLESSATO SU CAMPIONI DI SIERO O PLASMA-EPARINA
CAT. NO. BI-20462 12 X 8 DETERMINAZIONI

(ES) INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO DE 3ª GENERACIÓN PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE RANKL* LIBRE SOLUBLE NO ACOMPLEJADO HUMANO EN SUERO O EN PLASMA CON HEPARINA
CAT. NO. BI-20462 12 X 8 TESTS

*Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand (RANKL)

CE

rev.no. 141126

BIOMEDICA
Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Tel. +43/1/291 07 45, Fax +43/1/291 07 85, E-mail export@bmgrp.com

CONTENT / INHALT / SOMMAIRE / CONTENUTO / CONTENIDO

ENGLISH	**Page 3**
DEUTSCH	**Seite 7**
FRANCAIS	**Page 11**
ITALIANO	**Pagina 15**
ESPANOL	**Pagina 19**

Additional information on our products is available on our website.
Zusätzliche Information zu unseren Produkten ist auf unserer Homepage erhältlich.
Pour toute information complémentaire sur nos produits, visiter notre site Internet.
Ulteriori informazioni sui nostri prodotti possono essere cercate sulla nostra home page.
Encontrará información adicional sobre nuestros productos en nuestra página web.

www.bmgrp.com

Authorized Representative:

mdi Europa GmbH
Langenhagener Str. 71
D-30855 Hannover-Langenhagen

1) INTRODUCTION

RANKL, the receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, a member of the tumor necrosis factor (TNF) family (http://www.uniprot.org/uniprot/O14788), is the main stimulatory factor for the formation of mature osteoclasts and is essential for their survival. RANKL activates its specific receptor RANK, located on osteoclasts and dendritic cells. The effects are counteracted by OPG which acts as an endogenous soluble receptor antagonist (see: BI-20403 – OPG ELISA).

The major source of RANKL are osteocytes, former osteoblasts that become embedded within the mineralized bone matrix. RANKL is a ~35 kD type II transmembrane-type protein and is cleaved to release a soluble biologically active product that forms a homotrimer.

RANKL and its specific receptor RANK are not only key regulators of bone remodeling but also play an essential role in immunobiology, e.g. lymph node formation, establishment of the thymic microenviroment, mammary gland development during pregnancy, bone metastasis in cancer and sex-hormone, progestin-driven breast cancer, thermoregulation, and finally in the development of type 2 diabetes mellitus.

Possible Indications:

- Postmenopausal and senile osteoporosis
- Glucocorticoid induced osteoporosis
- Disease with locally increased resorption activity
- Arthritis
- Oncology
- Type 2 diabetes mellitus

2) CONTENTS OF THE KIT

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Human recombinant OPG pre-coated microtiter strips in strip holder	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer concentrate 20x, natural cap	1 x 50 ml
ASYBUF	Assay buffer, red cap, ready to use	1 x 7 ml
AB	Goat polyclonal biotinylated anti sRANKL antibody, green cap, ready to use	1 x 22 ml
STD	Standards (0; 0.0625; 0.125; 0.25; 0.5; 1; 2 pmol/l), white caps	7 vials lyophilised
CTRL	Controls A+B, recombinant human RANKL in human serum, yellow caps, exact concentration after reconstitution see label	2 vials lyophilised
CONJ	Conjugate (streptavidin-polyHRPO), amber cap, ready to use	1 x 22 ml
SUB	Substrate (TMB solution), amber bottle, blue cap, ready to use	1 x 22 ml
STOP	Stop solution, white cap, ready to use	1 x 7 ml

3) ADDITIONAL MATERIAL SUPPLIED IN THE KIT

- 3 self-adhesive plastic films
- QC protocol
- Protocol sheet
- Instruction manual for use

4) MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 50 µl, 150 µl, 200 µl, 300 µl and disposable tips
- Distilled or deionised water
- Plate washer is recommended for washing, alternative multichannel pipette or manifold dispenser
- Refrigerator with 4°C (2-8°C)
- ELISA reader capable of measuring absorbance at 450 nm (with correction wavelength at 630 nm)
- Graph paper or software for calculation of results

5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

All reagents of the kit are stable at 4°C (2-8°C) until the expiry date stated on the label of each reagent.

Sample preparation:

Collect venous blood samples by using standardized blood collection tubes for serum or Heparin plasma. We recommend performing plasma or serum separation by centrifugation as soon as possible, e.g. 10 min at 2000 x g, preferably at 4°C (2-8°C). If this is not possible, store the samples at 4°C (2-8°C) prior to centrifugation (maximal one day).The acquired plasma or serum samples should be measured as soon as possible. For longer storage aliquot samples and store at -25°C or lower. Samples should undergo 3 freeze-thaw cycles only. Lipemic or haemolysed samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicates for all values. If samples read higher than the top standard, we recommend diluting with a low-measuring serum sample and re-measuring the samples.

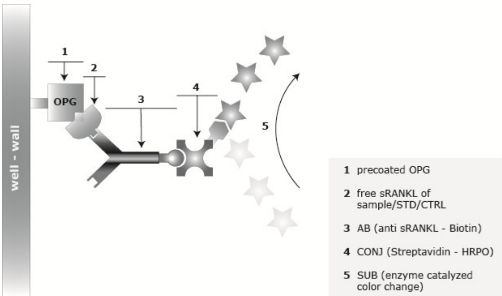
For further information on sample stability please visit our website www.bmgrp.com (see Technical Files) or contact our customer service by e-mail export@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

Reconstitution / Handling:

STD (Standards) and CTRL (Controls): Pipette 700 µl of distilled or deionised water into each vial. Leave at room temperature (18-24°C) for 15 min. Reconstituted STD and CTRL are stable at -25°C or lower until expiry date stated on label. STDs and CTRLs are stable for 3 freeze-thaw cycles.

WASHBUF (Wash buffer): Dilute the concentrate 1:20 (e.g. 50 ml WASHBUF + 950 ml distilled water). Crystals in the buffer concentrate will dissolve at room temperature. The undiluted buffer is stable at 4°C (2-8°C) until expiry date stated on label. The diluted WASHBUF is stable up to one month at 4°C (2-8°C). Only use diluted WASHBUF (Wash buffer) when performing the assay.

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY:



7) ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples must be at room temperature (18-24°C) before use in the assay.
Mark position for BLANK/STD/SAMPLE/CTRL (Blank/Standard/Sample/Control) on the protocol sheet.
Take microtiter strips out of the aluminium bag, take a minimum of one well as blank. Store unused strips with desiccant at 4°C (2-8°C) in the aluminium bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.

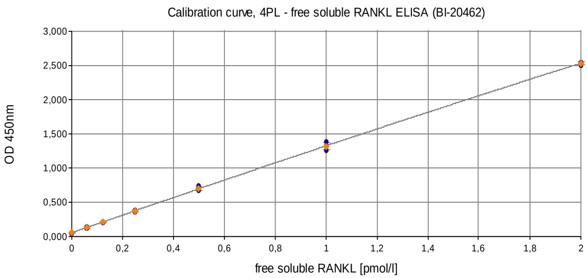
1.	**Prewash wells** with 300 µl diluted WASHBUF (wash buffer, natural cap) five times. Remove remaining WASHBUF by tapping plate against paper towel after the last wash.
2.	Add 50 µl ASYBUF (assay buffer, red cap) into each well. Pipette additional 150 µl ASYBUF into well marked as blank.
3.	Pipette 150 µl STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective wells, except blank.
4.	**Cover tightly and incubate at room temperature (18-24°C) for 2 hours.**

5.	Aspirate and wash wells with 300 µl diluted WASHBUF (wash buffer, natural cap) five times. Remove remaining WASHBUF by tapping plate against paper towel after the last wash.
6.	Add 200 µl AB (biotinylated anti sRANKL antibody, green cap) into each well, except blank. Swirl gently. Pipette additional 200 µl ASYBUF (assay buffer, red cap) into well marked as blank.
7.	**Cover tightly and incubate at 4°C (2-8°C) over night (18-24 hours).**
8.	Aspirate and wash wells with 300 µl diluted WASHBUF (wash buffer, natural cap) fives times. Remove remaining WASHBUF by tapping plate against paper towel after the last wash.
9.	Add 200 µl CONJ (conjugate, amber cap) into each well.
10.	**Cover tightly and incubate at room temperature (18-24°C) for 1 hour in the dark.**
11.	Aspirate and wash wells with 300 µl diluted WASHBUF (wash buffer, natural cap) fives times. Remove remaining WASHBUF by tapping plate against paper towel after the last wash.
12.	Add 200 µl SUB (substrate, blue cap) into each well.
13.	**Incubate at room temperature (18-24°C) for 30 min in the dark.**
14.	Add 50 µl STOP (stop solution, white cap) into each well.
15.	Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm if available.

8) CALCULATION OF RESULTS

Read the optical density (OD) of all wells on a plate reader using 450 nm wavelength (correction wavelength 630 nm). Subtract the blank OD from the values of STD, CTRL and sample. Construct the standard curve from the OD values of the STD. Use commercially available software or graph paper. Calculate sample concentration from the standard curve. The assay was evaluated with 4PL algorithm. Different curve-fitting methods need to be evaluated by the user.

Example typical STD-curve:



The quality control protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit lot. Data for optical density obtained by customers may differ due to various influences and/or due to the normal decrease of signal intensity during shelf life. However, this does not affect validity of results as long as an OD of 1.50 or more is obtained for the standard with the highest concentration and the values of the CTRLs are in range (target ranges see labels).

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Values of apparently healthy individuals:	Median (serum, n = 32): 0.14 pmol/l Each laboratory should establish its own reference range for the samples under investigation. Do not change sample type during study.
Standard range:	0; 0.0625; 0.125; 0.25; 0.5; 1; 2 pmol/l
Conversion factor pg/ml to pmol/l:	1 pg/ml = 0.05 pmol/l (MW: 20 kD, monomer)
Sample volume:	150 µl human serum or Heparin plasma
Detection limit / LLOQ:	(0 pmol/l + 3 SD): 0.01 pmol/l / 0.008pmol/l
Incubation time:	2 h / overnight / 1 h / 30 min

10) PRECISION

Intra-assay: 2 samples of known concentrations were tested 5 times within one kit lot by one operator.
Inter-assay: 2 samples of known concentrations were tested 12 times within 3 different kit lots and by 3 different operators.

Intra-assay (n=5)	Sample 1	Sample 2	Inter-assay (n=12)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/l)	0.12	1.00	Mean (pmol/l)	0.12	1.00
SD (pmol/l)	0.005	0.04	SD (pmol/l)	0.004	0.02
CV (%)	4	4	CV (%)	3	2

Further details on validation data and assay characteristics please visit our website www.bmgrp.com (see Technical Files) or contact our customer service by e-mail export@bmgrp.com or by phone +43/ 1/ 29107-45.

11) TECHNICAL HINTS

- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- Do not mix stoppers and caps from different reagents or use reagents between lots.
- Do not use reagents beyond expiration date.
- Protect reagents from direct sunlight.
- Substrate solution should remain colourless until added to the plate.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.

12) PRECAUTIONS

All test components of human source were tested against HIV-Ab and HBsAg and were found negative. Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious.
All liquid reagents contain ≤ 0.1% Proclin 300 as preservative. Avoid contact with skin and mucous membrane. Proclin 300 is not toxic in concentrations used in this kit. It may cause allergic skin reactions – avoid contact with skin or eyes.

- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where reagents are used.
- Wear gloves, glasses and lab coat while performing this assay.
- Sulfuric acid is irritating to the eyes and skin. Avoid contact with skin and mucous. Irritations are possible. Flush with water if contact occurs!!

13) LITERATURE

- Immunology and bone. Danks L and Takayanagi H, J Biochem 2013; 154: 29-39.
- Physiology and pathophysiology of the RANKL/RANK system. Hanada R et al., Biol Chem 2010; 391(12): 1365-1370.
- Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. Nakashima T et al., Nat Med 2011; 17(10): 1231-1234.
- RANKL Employs Distinct Binding Modes to Engage RANK and the Osteoprotegerin Decoy Receptor. Nelson CA et al., Structure, Nov 2012; 20(11): 1971-1982.
- Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer. Schramek D et al., Nature 2010; 468(7320): 98-102.
- RANK ligand mediates progestin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. Gonzalez-Suarez E et al., Nature 2010; 468: 103-107.
- Central regulation of body temperature by RANKL/RANK pathway. Hanada R and Penninger JM, Clin Calcium 2011; 21(8): 1201-1208.
- Blockade of receptor activator of nuclear factor-κB (RANKL) signaling improves hepatic insulin resistance and prevents development of diabetes mellitus. Kiechl S et al., Nature Medicine 2013; 19(3):358-363.

1) EINLEITUNG

RANKL, der Rezeptor Activator des Nuklear Faktor (NF) kappa B Ligand, gehört zur Familie der Tumor Nekrose Faktoren (TNF, (http://www.uniprot.org/uniprot/O14788). RANKL ist der wichtigste Faktor für die Reifung und Proliferation der Osteoblasten. RANKL bindet an seinen spezifischen Rezeptor RANK, der von Osteoklasten und dentritischen Zellen exprimiert wird. Als Gegenspieler zu RANKL fungiert Osteoprotegerin (OPG), ein löslicher endogener Rezeptor Antagonist (siehe: BI-20403 – OPG ELISA).

RANKL wird hautpsächlich von Osteozyten gebildet, ehemaligen Osteoblasten, die in der mineralisierten Knochenmatrix eingebettet sind. RANKL ist ein ~35 kD Typ II Transmembran-Protein und bildet bei Freisetzung einen löslichen, biologisch aktiven Komplex aus Homotrimeren.

RANKL und sein spezifischer Rezeptor RANK sind nicht nur Schlüssel-Regulatoren bei der Knochenbildung, sondern spielen auch eine wichtige Rolle in der Immunbiologie, zB bei der Lymphknotenbildung, bei der Schaffung der Mikroumgebung des Thymus, bei der Brustdrüsenentwicklung während der Schwangerschaft, bei Knochenmestatasen sowie Progestin-bedingtem Brustkrebs, der Wärmeregulation und schließlich in der Entwicklung von Typ-2-Diabetes mellitus.

Indikationen:

- Postmenopausale und senile Osteoporose
- Glukokortikoid induzierte Osteoporose
- Arthritis
- Krankheiten mit lokal induzierter Knochenresorptionsaktivität
- Onkologie
- Typ-2-Diabetes Mellitus

2) INHALT DES KITS

CONT	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Humanes rekombinantes OPG, beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter	12 x 8 Tests
WASHBUF	Waschpuffer, 20fach Konzentrat, durchsichtiger Schraubverschluss	1 x 50 ml
ASYBUF	Verdünnungspuffer, roter Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml
AB	polyklonaler biotinylierter Ziege anti sRANKL Antikörper, grüner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
STD	Standards (0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 pmol/l), weißer Schraubverschluss, lyophilisiert	7 x lyophilisiert
CTRL	Kontrollen A+B, rekombinantes humanes RANKL in humanem Serum, gelber Schraubverschluss, lyophilisiert, genaue Konzentration nach Rekonstitution siehe Etikett	2 x lyophilisiert
CONJ	Konjugat (Streptavidin-PolyHRPO), brauner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
SUB	Substrat (TMB Lösung) braunes Fläschchen, blauer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
STOP	Stopplösung, weißer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 ml

3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- 3 selbstklebende Abdeckfolien
- QC Protokoll
- Protokollblatt
- Arbeitsanleitung (Beipacktext)

4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 50 µl, 150 µl, 200 µl, 300 µl inklusive Pipettenspitzen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Mikrotiterplattenwascher wird empfohlen
- Kühlschrank 4°C (2-8°C)
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (mit Referenzwellenlänge 630 nm wenn verfügbar)
- Millimeterpapier oder Software

5) REAGENZIEN UND PROBENVORBEREITUNG

Alle Reagenzien des Kits sind bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum (siehe Etikett des Reagenz) stabil.

Probenvorbereitung:

Abnahme von venösem Blut mittels standardisierter Blutabnahmeröhrchen zur Gewinnung von Serum oder Plasma. Wir empfehlen die Zentrifugation des Blutes für 10 Minuten bei 2000g, bevorzugt bei 4°C (2-8°C), so schnell wie möglich. Das Blut kann vor der Zentrifugation bei 4°C (2-8°C) bis zu 24 Stunden gelagert werden.
Das gewonnene Serum oder Plasma soll so bald wie möglich gemessen werden. Für eine Lagerung sollen die Proben aliquotiert und bei -25°C oder niedriger gelagert werden. Bis zu drei Frier/Tau-Zyklen verändern die Messwerte nicht. Lipämische und hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern. Proben vor Verwendung gut mischen. Wir empfehlen Doppelbestimmungen für alle Werte.

Proben mit Ergebnissen über dem höchsten Standard (2 pmol/l) können mit niedrig messendem Serum verdünnt und erneut getestet werden.

Nähere Informationen zur Probenstabilität finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com (s. Technical Files) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice, e-mail unter export@bmgrp.com, Tel. unter +43/ 1/ 29107-45.

Rekonstitution / Handhabung:

STD (Standards) und CTRL (Kontrolle): Lösen Sie das Lyophilisat in jeweils 700 µl destilliertem Wasser bei Raumtemperatur (18-24°C) für 15 min. Die rekonstituierten STD und CTRL sind bei -25°C bis zum Ablaufdatum haltbar. STDs und CTRLs sind bis zu drei Frier-/Tauzyklen stabil.

WASHBUF (Waschpuffer): Das mitgelieferte Konzentrat wird 1:20 verdünnt (zB. 50 ml WASHBUF + 950 ml destilliertes Wasser). Kristalle im Pufferkonzentrat lösen sich bei Raumtemperatur auf. Das Konzentrat ist bei 4°C (2-8°C) bis zum Ablaufdatum haltbar. Der verdünnte Puffer ist bei 4°C (2-8°C) bis zu einem Monat haltbar. Im Testsystem darf nur verdünnter WASHBUF (Waschpuffer) verwendet werden.

6) TESTPRINZIP

Siehe Kapitel 6) PRINCIPLE OF THE ASSAY im englischen Teil des Beipacktextes

7) TESTPROTOKOLL

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-24°C) aufweisen.
Markieren Sie die Positionen für BLANK/STD/PROBE/CTRL (Leerwert/Standard/Probe/Kontrolle) am Protokollblatt.
Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Aluminiumbeutel. Mindestens 1 Well für den Leerwert reservieren. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können mit Trockenmittel im Aluminiumbeutel bei 4°C (2-8°C) bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.

1.	**Wells vorwaschen**: Die vorbereiteten Wells 5x mit 300 µl WASHBUF (Waschpuffer, durchsichtiger Schraubverschluss) waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	Pipettieren Sie 50 µl ASYBUF (Verdünnungspuffer, roter Schraubverschluss) in alle wells. Pipettieren Sie zusätzlich 150 µl ASYBUF in den Blank.
3.	Pipettieren Sie 150 µl STD/PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen, mit Ausnahme des Leerwertes.
4.	**Streifen gut abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-24°C) inkubieren.**

5.	Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer, durchsichtiger Schraubverschluss) waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
6.	Pipettieren Sie 200 µl AB (biotinylierter sRANKL Antikörper, grüner Schraubverschluss) in alle Wells, mit Ausnahme des Leerwertes. Pipettieren Sie 200 µl ASYBUF (Verdünnungspuffer, roter Schraubverchluss) in den Leerwert. Gut mischen.
7.	**Streifen gut abdecken und über Nacht (18-24 Stunden) bei 4°C (2-8°C) inkubieren.**
8.	Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer, durchsichtiger Schraubverschluss) waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
9.	Pipettieren Sie 200 µl CONJ (Konjugat, brauner Schraubverschluss) in alle Wells.
10.	**Streifen gut abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-24°C) im Dunkeln inkubieren.**
11.	Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer, durchsichtiger Schraubverschluss) waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
12.	Pipettieren Sie 200 µl SUB (Substrat, blauer Schraubverschluss) in alle Wells.
13.	**30 Minuten bei Raumtemperatur (18-24°C) im Dunkeln inkubieren.**
14.	Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung, weißer Schraubverschluss) in alle Wells.
15.	Extinktion unmittelbar bei 450 nm messen, mit 630 nm als Referenz, falls möglich.

8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Messen Sie die optische Dichte (OD) von allen Wells mit einem Mikrotiterplattenphotometer mit einem 450 nm Filter (Referenz 630 nm). Die OD des Leerwertes ist von den Werten der STD, CTRL und Proben abzuziehen. Konstruieren Sie eine Standardkurve aus den OD Werten der STD unter Verwendung von kommerziell erhältlichem Millimeterpapier oder einer geeigneten Software.
Das Testsystem wurde mit einem 4 Parameter Algorithmus evaluiert. Andere Auswerte Algorithmen müssen vom Verwender evaluiert werden. Die Konzentration der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen.

Typische STD-Kurve:
Siehe Kapitel 8) CALCULATION OF RESULTS im englischen Teil des Beipacktextes.

Auf dem beigepackten QC Protokoll sind die Resultate bei der QC Freigabe der jeweiligen Kitlot vermerkt. Vom Verwender erhaltene Daten der OD können abweichend sein, bedingt durch verschiedene Einflüsse und/oder dem normalen Signalverlust des Kits während der Laufzeit. Dieser mögliche Signalverlust hat keinen Einfluss auf die Gültigkeit der Resultate, so lange die OD des höchsten Standards den Wert 1,50 oder höher erreicht und die Werte beider CTRL im gültigen Bereich sind (Bereich siehe Etiketten beider Kontrollen).

9) TESTMERKMALE

Werte von anscheinend gesunden Spendern:	Median: (serum, n=32): 0,14 pmol/l Jeder Verwender sollte den Normalbereich für seine Proben evaluieren. Wechseln Sie nicht die Probenmatrix innerhalb einer Studie.
Standardbereich:	0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 pmol/l
Umrechnungsfaktor pg/ml zu pmol/l:	1 pg/ml = 0,05 pmol/l (MW: 20 kD, Monomer)
Probenvolumen:	150 µl Serum oder Heparin Plasma
Detektionsgrenze / LLOQ:	(0 pmol/l + 3 SD): 0,01 pmol/l / 0,008pmol/l
Inkubationszeiten:	2 h / über Nacht / 1 h / 30 Min

Nähere Informationen zu den Testmerkmalen finden Sie auf unserer Website unter www.bmgrp.com oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice, e-mail unter export@bmgrp.com, Tel. unter +43/ 1/ 29107-45.

10) PRÄZISION

Intra-Assay: 2 Proben mit bekannter Konzentration wurden 5-mal in Doppelbestimmung in einem Test getestet.
Inter-Assay: 2 Proben mit bekannter Konzentration wurden 12-fach in 3 unterschiedlichen Kit Lots von 3 unterschiedlichen Operatoren getestet.

Intra-Assay (n=5)	Probe 1	Probe 2	Intrer-Assay (n=12)	Probe 1	Probe 2
Durchschnitt (pmol/l)	0,12	1,00	Durchschnitt (pmol/l)	0,12	1,00
SD (pmol/l)	0,005	0,04	SD (pmol/l)	0,004	0,02
VK (%)	4	4	VK (%)	3	2

Weitere Daten zur Validierung und der Kit Charakterisierung finden Sie auf unserer Webseite www.bmgrp.com (s. Technical Files) oder kontaktieren Sie unseren Kundenservice, e-mail unter export@bmgrp.com, Tel. unter +43/ 1/ 29107-45.

11) TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien von verschiedenen Lots oder Tests dürfen nicht gemischt werden.
- Stöpsel oder Verschlüsse von verschiedenen Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.
- Reagenzien sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen.
- Substratlösung muss vor Verwendung farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen bei den Inkubationen gut mit Abdeckfolie abgedeckt sein, wo notwendig.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

12) VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Bestandteile humanen Ursprunges wurden auf HIV-Ak und HBsAg getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden.
Alle flüssigen Reagenzien enthalten 0,01% Proclin 300 als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut oder Schleimhaut. Proclin 300 ist in der verwendeten Konzentration nicht toxisch. Allergische Reaktionen sind möglich.

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nicht Rauchen, Essen, Trinken oder Kosmetika benutzen während der Verwendung der Testreagenzien.
- Verwenden Sie Handschuhe zur Vermeidung jeden Kontaktes mit Reagenzien.
- Die Stopplösung enthält Schwefelsäure. Diese reizt Augen und Haut. Bei Berührung gründlich mit Wasser spülen.

13) LITERATUR

Siehe Kapitel 13) LTERATURE im englischen Teil des Beipacktextes.

1) INTRODUCTION

Le sRANKL, récepteur activateur soluble du ligand NF-kB, est un membre de la famille TNF (Facteur Onconécrosant, (http://www.uniprot.org/uniprot/O14788). Il est le principal facteur stimulateur pour la formation d'ostéoclastes mûrs et est indispensable à leur survie. RANKL active son récepteur spécifique, RANK, qui se trouve sur les ostéoclastes et les cellules dendritiques. Ces effets sont contrés par l'OPG (voir ELISA réf : BI-20403) qui est secrété par divers tissus et agit comme antagoniste des récepteurs solubles endogènes.

La source principale de RANKL est les ostéocytes, d'anciens ostéoblastes qui ont été intégrés à la matrice minérale osseuse. Le RANKLest une protéine transmembranaire de type II d'environs 35kD et est clivé pour formé un produit soluble biologiquement actif qui forme un homotrimer.

Le RANKL et son récepteur spécifique RANK ne sont pas seulement des facteurs de régulations clés dans le remodelage osseux, mais jouent aussi un rôle dans l'immunobiologie, par exemple: formation des nodes lymphatiques, établissement du microenvironement thymique, le développement des glandes mammaires durant la grossesse, les métastases osseuses dans les cancers hormono dépendants, les cancers du sein récepteur-progestérone positif, la thermorégulation et finalement dans le développement du diabète de type 2.

Indications:

- Ostéoporose post-ménopausique ou sénile
- Ostéoporose induite par les glucocorticoïdes
- Maladies entraînant une activité de résorption osseuse locale accrue
- Arthrite
- Oncologie
- Diabète de type II

2) CONTENUE DE LA TROUSSE

CONT	COMPOSANT DE LA TROUSSE	QUANTITE
PLATE	Plaque de bandelettes de microtitrage revêtues d'OPG recombinant humain avec portoir de bandelettes	12 x 8 tests
WASHBUF	Tampon de lavage à concentration 20x, bouchon couleur neutre	1 x 50 ml
ASYBUF	Tampon d'échantilonage, bouchon rouge, prêt à l'emploi	1 x 7 ml
AB	Anticorps polyclonal de chèvre avec anti-sRANKL biotinylés, bouchon vert, prêt à l'emploi	1 x 22 ml
STD	Standards (0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 pmol/l), bouchon blanc, lyophilisés.	7 flacons lyophilisés
CTRL	Contrôles A+B lyophilisé, RANKL humain recombiné dans du sérum humain, bouchon jaune. Voir l'étiquette pour la concentration exacte après reconstitution.	2 flacons lyophilisés
CONJ	Conjugué (streptavidin-polyHRPO), bouchon ambre, prêt à l'emploi	1 x 22 ml
SUB	Substrat (solution TMB), bouteille ambré, bouchon bleu, prêt à l'emploi	1 x 22 ml
STOP	Solution STOP, bouchon blanc, prête à l'emploi	1 x 7 ml

3) AUTRE MATERIEL INCLUS DANS LA TROUSSE

- 3 bandes de film adhésif
- Le protocole de vérification de contrôle qualité
- Une feuille de protocole
- Le manuel d'utilisation

4) MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Micropipettes de précision calibrées à 50 µl, 150 µl, 200 µl, 300 µl avec embouts jetables
- Eau distillée ou désionisée
- Laveur de microplaques utile lors des étapes de lavages
- Réfrigérateur à température 4°C (2-8°C)

- Lecteur de microplaques ELISA avec lecture d'absorbance à 450 nm (avec correction de longueur d'onde à 630 mm)
- Papier millimétré ou logiciel pour le calcul des résultats

5) PREPARATION DES REACTIFS ET DES ECHANTILLONS

Tous les réactifs de la trousse restent stables à 4°C (2-8°C) jusqu'à la date de péremption (voir étiquette du réactif).

Préparation des échantillons:

Prélever un échantillon de sang veineux en utilisant des tubes de prélèvement standard pour sérum ou plasma hépariné. On recommande la séparation du plasma ou du sérum par centrifugation dès que possible, par exemple: 10 minutes à 2000 x g, de préférence à 4°C (2-8°C). S'il y a un délai avant la centrifugation, il faut stocker les échantillons à 4°C (2-8°C) avant la centrifugation pendant 24 heures au maximum. Le sérum ou le plasma obtenu devrait être testés dès que possible. Pour une période de stockage plus longue, préparer un aliquot des échantillons et les entreposer dans une chambre froide à -25°C ou plus bas. Le nombre de cycle de congélation/décongélation maximal pour tout échantillon est de 3. Des échantillons lipémique ou hémolyses peuvent donner des résultats erronés. Les échantillons doivent être agités avant l'analyse. Il est recommandé de doser les standards, contrôles et échantillons en double. Les échantillons qui donnent les valeurs plus élevées que le dernier standard doivent être dilué avec un sérum négatif en sRANKL.

Vous trouverez de plus amples informations sur la stabilité des échantillons en consultant notre site web à l'adresse www.bmgrp.com (voir Technical Files) ou contactez notre service clientèle à l'adresse email export@gmbrp.com, ou en composant le numéro de téléphone +43/1/29107-45.

Reconstitution / Manipulation:

STD (Standards) et CTRL (Contrôles): Reconstituer dans chaque flacons 700 µl d'eau désionisée ou distillée et laisser à température ambiante (18-24°C) pendant 15 minutes. Les standards et les contrôles restent stables à -25°C jusqu'à la date de péremption marquée sur l'étiquette. Eviter de faire plus que 3 cycles répétés de congélation / décongélation.

WASHBUF (Tampon de lavage): Diluer le concentré à 1:20. Par exemple, 50 ml de WASHBUF + 950 ml d'eau distillée. Les cristaux dans le concentré de lavage se dissoudront à température ambiante. Le tampon concentré reste stable à 4°C (2-8°C) jusqu'à la date de péremption mentionnée sur l'étiquette. Le tampon dilué reste stable à 4°C (2-8°C) jusqu'à un mois. Utiliser uniquement du WASHBUF (Tampon de lavage) dilué pour l'exécution du dosage.

6) PRINCIPE DE L'ESSAI

Voir le chapitre 6) PRINCIPLE OF THE ASSAY de la version anglaise de la notice.

7) PROTOCOLE DE L'ESSAI

Tous les réactifs et échantillons doivent être à température ambiante (18-24°C) avant l'utilisation.
Marquer la position du BLANK/STD/SAMPLE/CTRL (Blanc/Standard/Echantillon/Contrôle) sur la feuille du protocole.
Sortir du sac d'aluminium les bandelettes de microtitrage et marquer correctement les bandelettes, marquant au minimum un puits comme Blanc. Conserver les bandelettes non-utilisées, avec leur dessiccateur, à 4°C (2-8°C) dans le sac d'aluminium. Les bandelettes restent stables jusqu'à la date d'expiration marquée sur l'étiquette.

1.	**<u>Prélaver les puits</u>** en lavant et en aspirant 5 fois les puits avec 300 µl de WASHBUF (Tampon de lavage, bouchon de couleur neutre) dilué. Après le dernier lavage, taper la plaque contre une serviette afin d'enlever les dernières gouttes de WASHBUF.
2.	Ajouter 50 µl d'ASYBUF (tampon d'échantillonage, bouchon rouge) dans chaque puis. Pipetter 150 µl d'ASYBUF dans le puits du blanc.
3.	Ajouter 150 µl de STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Échantillon/Contrôle) en duplicata dans les puits respectifs sauf le blanc.
4.	**Sceller la plaque et incuber pendant 2h à température ambiante (18-24°C).**

5.	Aspirer et laver 5 fois les puits avec 300 µl de WASHBUF (Tampon de lavage, bouchon de couleur neutre) dilué. Après le dernier lavage, taper la plaque contre une serviette afin d'enlever les dernières gouttes de WASHBUF.
6.	Ajouter 200 µl d'AB (anticorps anti sRANKL biotinylé, bouchon vert) dans chaque puits, sauf le blanc. Agiter doucement. Pipetter 200 µl d'ASYBUF (tampon d'échantillonage, bouchon rouge) dans le puits du blanc.
7.	**Sceller la plaque et incuber pendant 18-24h à 4°C (2-8°C).**
8.	Aspirer et laver 5 fois les puits avec 300 µl de WASHBUF (Tampon de lavage) dilué. Après le dernier lavage, taper la plaque contre une serviette afin d'enlever les dernières gouttes de WASHBUF.
9.	Ajouter 200 µl de CONJ (conjugué, bouchon ambré) dans chaque puits.
10.	**Sceller la plaque et incuber pendant 1h à température ambiante (18-24°C) et à l'abri de la lumière.**
11.	Aspirer et laver 5 fois les puits avec 300 µl de WASHBUF (Tampon de lavage) dilué. Après le dernier lavage, taper la plaque contre une serviette afin d'enlever les dernières gouttes de WASHBUF.
12.	Ajouter 200 µl de SUB (substrat, bouchon bleu) dans chaque puit.
13.	**Incuber pendant 30 minutes à température ambiante (18-24°C) à l'abri de la lumière.**
14.	Ajouter 50 µl de STOP (solution stop, bouchon blanc) dans chaque puit.
15.	Mesuré immédiatement l'absorbance à 450 nm avec référence à 630 nm si possible.

8) CALCUL DES RESULTATS

Lire la densité optique (DO) de tous les puits sur un lecteur de microplaque à longueur d'onde de 450 nm (correction de longueur d'onde à 630 nm). Soustraire l'absorbance du blanc des valeurs STD, CTRL et des échantillons. Construire la courbe d'étalonnage à partir des valeurs des étalons, utilisant du papier millimétré vendu couramment dans le commerce ou un logiciel prévu à cet effet.

Obtenir la concentration des échantillons à partir de la courbe d'étalonnage. Cette méthode a été évaluée en utilisant un algorithme 4PL. Les autres types de courbes doivent être évalués par l'utilisateur. Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs normales.

Courbe STD typique:

Voir le chapitre 8) CALCULATION OF RESULTS dans la version anglaise de la notice d'utilisation.

Le protocole de contrôle qualité fourni avec la trousse présente les résultats de la dernière série CQ de chaque trousse. Les données de densité optique obtenues par les utilisateurs peuvent être différentes de celles obtenues par le Laboratoire de Contrôle. Cela dépend de plusieurs facteurs, notamment de la perte du signal que l'on constate pendant la durée de vie d'un kit. Cependant, ceci n'a pas d'incidence sur la validité des résultats, à partir du moment où la D.O. du standard ayant la concentration la plus élevée est au moins égale à 1,50 unités et que les valeurs des contrôles sont dans les normes de valeurs possibles (voir étiquette pour les normes de valeurs).

9) CARACTERISTIQUES DU DOSAGE

Gamme de valeurs normales:	Median: (sérum, n=32) : 0,14 pmol/l Nous recommandons à chaque laboratoire d'établir son propre intervalle de valeurs normales. Ne pas changer le type d'enchantillon durant l'étude.
Gamme de standard:	0; 0,625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 pmol/l
Facteur de conversion pg/ml à pmol/l:	1 pg/ml = 0,05 pmol/l (MW: 20 kD, monomère)
Volume de l'échantillon:	150 µl plasma hépariné ou sérum
Limite de détection/LLoQ:	(0 pmol/l + 3 SD): 0,01 pmol/l / 0,008pmol/l
Temps d'incubation :	2 h / pendant la nuit / 1 h / 30 min

10) PRECISION

Précision intra-série : 2 échantillons ont été testés 5 fois en utilisant la même trousse et le même opérateur.
Précision inter-séries : 2 échantillons ont été testés 12 fois en utilisant 3 trousses différentes avec 3 opérateurs différents.

Intra-série (n=5)	Enchantillon 1	Enchantillon 2	Inter-séries (n=12)	Enchantillon 1	Enchantillon 2
Moyenne (pmol/l)	0,12	1,00	Moyenne (pmol/l)	0,12	1,00
ET (pmol/l)	0,005	0,04	ET (pmol/l)	0,004	0,02
CV (%)	4	4	CV (%)	3	2

Vous trouverez de plus amples informations sur la stabilité des échantillons en consultant notre site web à l'adresse www.bmgrp.com (voir Technical Files) ou contactez notre service clientèle à l'adresse email export@gmbrp.com, ou en composant le numéro de téléphone +43/1/29107-45.

11) CONSEILS TECHNIQUES

- Ne pas remplacer ou mélanger les réactifs qui sont fournis avec ce kit avec ceux de lots ou de sources différents.
- Ne pas mélanger les embouts ou bouchons de réactifs différents, ni utiliser les réactifs d'autres lots.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date d'expiration.
- Protéger les réactifs contre la lumière.
- La solution de substrat doit être incolore.
- Pour obtenir les résultats fiables, il est essentiel de sceller correctement la microplaque pendant les étapes d'incubation.
- Eviter de faire mousser les réactifs lors du mélange.

12) PRECAUTIONS

Les produits d'origine humaine utilisés dans ce test ont été testés avec les essais contre le VIH-Ab et l'AgHbs et ont été trouvés négatifs. Cependant, ils doivent être manipulés comme étant susceptibles de transmettre des maladies infectieuses. Tous les réactifs liquides contiennent 0,01% de Proclin 300 comme conservateur. Eviter tout contact avec la peau et la muqueuse. Proclin 300 n'est pas toxique dans les concentrations utilisées dans cette trousse. Cependant, il peut entraîner les réactions allergiques et tout contact avec la peau ou les yeux doit être évité.

- Ne pas pipetter avec la bouche.
- Ne pas manger, boire, fumer, ni appliquer les produits cosmétiques pendant la manipulation des réactifs.
- Porter les gants pour éviter tout contact avec les réactifs.
- L'acide sulfurique irrite les yeux et la peau. Laver avec de l'eau en cas de contact. Eviter le contact avec la peau et les muqueuses. Les irritations sont possibles – laver avec de l'eau en cas de contact !!

13) LITERATURE

Voir au chapitre 13) LITERATURE dans la version anglaise de cette notice.

1) INTRODUZIONE

Il RANKL, l'attivatore del recettore del fattore nucleare legante kappa B, facente parte della famiglia del tumor necrosis factor (TNF) (http://www.uniprot.org/uniprot/O14788), è il principale fattore di stimolazione per la formazione degli osteoclasti maturi ed è essenziale per la loro sopravvivenza. Il RANKL attiva il suo specifico recttore RANK, situato sugli osteoclasti e sulle cellule dendritiche. Gli effetti sono contrastati da OPG che viene secreta da diversi tessuti e che agisce come antagonista endogeno del recettore solubile (vedi kit : BI-20403 – OPG ELISA).
La fonte principale di RANKL sono gli osteociti, ex osteoblasti che vengono incorporati all'interno della matrice ossea mineralizzata. Il RANKL è una proteina transmembrana di tipo II di ~35 kD e viene scissa per rilasciare un prodotto biologicamente attivo solubile che forma un omotrimero.
Il RANKL e il suo specifico recettore RANK non sono solo regolatori chiave del rimodellamento osseo, ma giocano anche un ruolo essenziale in immunologia, ad es. nella formazione del linfonodo, costituzione del microambiente timico, sviluppo della ghiandola mammaria durante la gravidanza, metastasi ossee nel cancro ed ormoni sessuali, cancro al seno progestinico-guidato, termoregolazione ed infine nello sviluppo diabete mellito di tipo 2.

Indicazioni del dosaggio:

- Osteoporosi in post-menopausa e senile
- Osteoporosi indotta da uso di glucocorticoidi
- Malattie con attività di rimodellamento osseo localmente aumentata
- Artrite
- Oncologia
- Diabete mellito di tipo 2

2) CONTENUTO DEL KIT

CONT	REATTIVI	QUANTITA'
PLATE	Micropiastra pre-sensibilizzata con OPG ricombinante umano e cornice per le strip	12 x 8 determinazioni
WASHBUF	Tampone per il lavaggio, concentrato 20x, tappo non colorato	1 x 50 mL
ASYBUF	Tampone di dosaggio, tappo rosso, pronto all'uso	1 x 7 mL
AB	Anticorpo di capra policlonale biotinilato anti sRANKL, tappo verde, pronto per l'uso	1 x 22 mL
STD	Standard (0; 0.0625; 0.125; 0.25; 0.5; 1; 2 pmol/l), tappo bianco	7 flaconi, liofilizzati
CTRL	Controlli A+B, RANKL ricombinante umano in siero umano, tappo giallo, vedere l'etichetta per l'esatta concentrazione dopo ricostituzione	2 flaconi, liofilizzati
CONJ	Coniugato, (streptavidina-poliHRPO), tappo ambra, pronto all'uso	1 x 22 mL
SUB	Substrato (soluzione di TMB), flacone color ambra, tappo blu, pronto all'uso	1 x 22 ml
STOP	Soluzione di arresto, tappo bianco, pronta all'uso	1 x 7 mL

3) MATERIALE AGGIUNTIVO CONTENUTO NEL KIT

- 3 copripiastra auto-adesivi
- Protocollo QC
- Templato
- Manuale di istruzioni d'uso

4) MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNTO

- Micropipette di precisione calibrate per volumi di 50 µl, 150 µl, 200 µl, 300 µl e puntali monouso
- Acqua distillata o deionizzata
- Lavatore automatico di micropiastre raccomandato per i lavaggi
- Frigorifero a 4°C (2-8°C)
- Lettore di micropiastre ELISA con filtro a 450 nm (e filtro di riferimento a 630 nm)
- Carta per grafici o software per il calcolo dei risultati

5) PREPARAZIONE DEI REATTIVI E DEI CAMPIONI

Tutti i reattivi contenuti nel kit sono stabili a 4°C (2-8°C) fino alla data riportata sull'etichetta di ciascun flacone.

Preparazione del campione:
Prelevare i campioni di sangue in provette per siero o plasma-eparina. Si consiglia di separare il plasma o il siero per centrifugazione il più presto possibile, ad es. 10 min at 2000 x g, preferibilmente a 4°C (2-8°C). Nel caso ciò non fosse possibile, conservare i campioni a 4°C (2-8°C) prima della centrifugazione (fino ad un giorno). Analizzare i campioni di siero o plasma il più presto possibile. Per conservazioni più prolungate nel tempo, aliquotare i campioni e congelarli a -25°C o a bassa. Ciascun campione può essere sottoposto ad un massimo di 3 cicli di congelamento-scongelamento. Campioni lipemici o emolizzati possono dare risultati aberranti. Mescolare bene i campioni prima del dosaggio. Lavorare in duplicato. I campioni con risultato superiore allo standard a concentrazione più elevata devono essere diluiti con un siero a bassa concentrazione di analita e ridosati.
Per ulteriori informazioni sulla stabilità dei campioni si prega di visitare il sito web www.bmgrp.com (vedere alla voce Technical Files) o contattare il distributore autorizzato locale.

Ricostituzione / Manipolazione:
STD (Standards) e CTRL (Controlli): A temperatura ambiente (18-24°C), aggiungere 700 µl di acqua deionizzata o distillata a ciascun flacone e lasciare a riposo per 15 min. STD e CTRL ricostituiti sono stabili a -25°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta di ciascun flacone. STD e CTRL sono stabili per 3 cicli di congelamento-scongelamento.

WASHBUF (Tampone di lavaggio): Diluire il tampone concentrato 1:20, ad es. 50 ml WASHBUF + 950 ml acqua distillata. I cristalli eventualmente presenti nel tampone concentrato, si disciolgono a temperatura ambiente. Il tampone concentrato è stabile a 4°C (2-8°C) fino alla data riportata sull'etichetta di flacone. Il tampone diluito è stabile a 4°C (2-8°C) per un mese. Utilizzare solo il WASHBUF (Tampone di lavaggio) diluito durante l'esecuzione del dosaggio.

6) PRINCIPIO DEL DOSAGGIO:

Vedi capitolo 6) PRINCIPLE OF THE ASSAY delle istruzioni in lingua inglese.

7) PROTOCOLLO DEL DOSAGGIO

Portare tutti i reattivi e i campioni a temperatura ambiente (18-24°C) prima di usarli per il dosaggio.
Evidenziare la posizione di BIANCO/STD/CAMPIONE/CTRL (Bianco/Standard/Campione/Controllo) sul protocol sheet.
Togliere le strip della micropiastra dalla confezione, considerare minimo un pozzetto per il Bianco. Conservare le strip inutilizzate con il dessiccante a 4°C (2-8°C) nella canfezione. Le strip sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.
1. **Prelavare i pozzetti** con 300 µl di WASHBUF diluito (tampone di lavaggio, tappo non colorato) per cinque volte. Togliere il WASHBUF restante picchiando la micropiastra su carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio.
2. Aggiungere 50 µl di ASYBUF (tampone di dosaggio, tappo rosso) in tutti i pozzetti. Pipettare altri 150 µl di ASYBUF nel pozzetto utilizzato per il bianco.
3. Pipettare 150 µl di STD/CAMPIONE/CTRL (Standard/Campione/Controllo) in doppio nei corrispondenti pozzetti, ad eccezione del bianco.
4. Coprire bene la micropiastra con il copripiastra adesivo e incubare a temperatura ambiente (18-24°C) eper 2 ore.
5. Aspirare e lavare i pozzetti con 300 µl di WASHBUF (tampone di lavaggio, tappo non colorato) diluito per cinque volte. Togliere il WASHBUF restante picchiando la micropiastra su carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio.
6. Aggiungere 200 µl di AB (anticorpo anti sRANKL biotinilato, tappo verde) in ciascun pozzetto, ad eccezione del bianco, agitare delicatamente la micropiastra. Pipettare altri 200 µl di ASYBUF (tampone di lavaggio, tappo rosso) nel pozzetto del bianco.
7. Coprire bene la micropiastra con il copripiastra adesivo e incubare a 4°C (2-8°C) overnight (18-24 ore).

8.	Aspirare e lavare i pozzetti con 300 µl di WASHBUF (tampone di lavaggio, tappo non colorato) diluito per cinque volte. Togliere il WASHBUF restante picchiando la micropiastra su carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio.
9.	Aggiungere 200 µl di CONJ (Coniugato, tappo ambra) in tutti i pozzetti.
10.	**Coprire bene la micropiastra con il copripiastra adesivo e incubare al buio a temperatura ambiente (18-24°C) per 1 ora.**
11.	Aspirare e lavare i pozzetti con 300 µl di WASHBUF (tampone di lavaggio, tappo non colorato) diluito per cinque volte. Togliere il WASHBUF restante picchiando la micropiastra su carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio.
12.	Aggiungere 200 µl di SUB (substrato, tappo blu) in tutti i pozzetti.
13.	**Incubare al buio a temperatura ambiente (18-24°C) per 30 min.**
14.	Aggiungere 50 µl di STOP (soluzione di arresto, tappo blanco) in tutti i pozzetti.
15.	Misurare subito l'assorbanza a 450 nm con filtro di riferimento a 630 nm, se disponibile.

8) CALCOLO DEI RISULTATI

Leggere le densità ottiche (OD) di ciascun pozzetto su un lettore di micropiastre utilizzando il filro a 450 nm (filtro di riferimento a 630 nm). Sottrarre la OD del bianco da quelle di STD, CTRL e campioni. Costruire la curva di calibrazione dai valori di OD degli standard. Usare software di calcolo disponibili in commercio oppure carta millimetrata. Calcolare la concentrazione dei campioni da questa curva di calibrazione. Il dosaggio qui presentato è stato valutato con l'algoritmo 4PL. Metodi di calcolo delle curve differenti, devono essere valutati dall'utilizzatore.

Esempio di curva STD tipica:

Vedi capitolo 8) CALCULATIONS OF RESULTS delle istruzioni in lingua inglese.

Il foglio di controllo di qualità fornito insieme al kit mostra i risultati ottenuti al rilascio finale di ogni kit dal Controllo di Qualità (QC). I valori di densità ottica ottenuti dagli utilizzatori possono essere differenti a causa di vari fattori e/o alla diminuzione nell'intensità del segnale derivata dal decadimento naturale del kit. In ogni caso, questo aspetto non incide sulla validità dei risultati finché la densità ottica del calibratore con la concentrazione più alta, sia superiore a 1,50 e i risultati dei controlli siano compresi nell'intervallo di riferimento (per gli intervalli di riferimento vedere le etichette dei flaconi).

9) CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO

Valori per individui apparentemente sani:	Mediana (siero, n = 32): 0.14 pmol/l Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i propri intervalli di riferimento in base alla popolazione esaminata. Non scambiare i campioni durante lo studio.
Intervallo standard:	0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 pmol/l
Conversione da pg/ml a pmol/l:	1 pg/ml = 0.05 pmol/l (MW: 20 kD, Monomero)
Volume del campione:	150 µl di siero o plasma-eparina umani
Sensibilità/LLOQ:	(0 pmol/L + 3 SD): 0,01 pmol/L / 0,008 pmol/L
Tempo di incubazione:	2 h / overnight / 1 h / 30 min

10) PRECISIONE

Intra-Saggio: 2 campioni a concentrazioni note sono stati dosati 5 volte con un lotto da un operatore.
Inter-Saggio: 2 campioni a concentrazioni note sono stati dosati con 12 con 3 lotti diversi da 3 diversi operatori.

Intra-Saggio (n=5)	Campione 1	Campione 2		Inter-Saggio (n=12)	Campione 1	Campione 2
Media (pmol/l)	0,12	1,00		Media (pmol/l)	0,12	1,00
SD (pmol/l)	0,005	0,04		SD (pmol/l)	0,004	0,02
CV (%)	4	4		CV (%)	3	2

Si prega di visitare il sito www.bmgrp.com (vedere la voce Technical Files) o di contattare il distributore autorizzato locale, nel caso si desideri controllare ulteriori dettagli sui dati di validazione e sulle caratteristiche del test.

11) ACCORGIMENTI TECNICI

- Non mescolare o sostituire i reattivi di lotti differenti.
- Non mescolare tra loro i tappi di differenti reattivi.
- Non usare reattivi oltre la loro data di scadenza.
- Proteggere i reattivi dalla luce solare diretta.
- Il substrato deve restare incolore fino alla sua aggiunta in micropiastra.
- Per assicurare l'ottenimento di risultati accurati, far aderire bene il copripiastra adesivo durante le incubazioni.
- Evitare la formazione di schiuma nel mescolare i reattivi.

12) PRECAUZIONI

Tutti i componenti del kit di origine umana sono stati testati con dosaggi per HIV-Ab e HBsAg e sono risultati essere negativi. Nonostante ciò, tali componenti devono essere manipolati e smaltiti come materiale potenzialmente infetto. Tutti i reattivi liquidi contengono Proclin 300 ≤ 0.1% come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose. Il Proclin 300 non è tossico nelle concentrazioni utilizzate in questo kit. Può causare reazioni cutanee di tipo allergico – evitare il contatto con la pelle o gli occhi.

- Non pipettare a bocca.
- Non mangiare, bere, fumare o usare cosmetici nei luoghi dove sono manipolati i reattivi.
- Evitare qualsiasi contatto con i reattivi utilizzando guanti monouso.
- L'acido solforico è irritante per gli occhi e la pelle. Evitare il contatto con la pelle e le mucose. Possibili irritazioni. Lavare con acqua dopo il contatto!!

13) BIBLIOGRAFIA

Vedi capitolo 13) LITERATURE delle istruzioni in lingua inglese.

1) INTRODUCCIÓN

El RANKL, ligando de receptor para el factor nuclear (kB, un miembro de la familia de factores de necrosis tumoral (TNF), es el principal factor estimulador de la formación de osteoclastos maduros y es esencial para su supervivencia. El RANKL activa su receptor específico, RANK, que se encuentra en los osteoclastos y las células dendríticas. Sus efectos son contrarrestados por la OPG, que actúa como un antagonista del receptor soluble endógeno (ver BI-20403 – OPG ELISA).

La fuente principal del RANKL son los osteocitos, antiguos osteoblastos que son embebidos en la matriz mineral ósea. El RANKL es una proteína transmembrana del tipo II, de 35 KD, y es proclive a liberar un producto soluble, biológicamente activo que forma un homotrímero.

El RANKL y su receptor específico RANK son, no solo factores reguladores claves del remodelamiento óseo, sino que tienen un papel esencial en inmunobiología, por ejemplo en la formación de nódulos linfáticos, en el establecimiento del microambiante tímico, en el desarrollo de la glándula mamaria en el embarazo, en la metástasis ósea, en el desarrollo del cáncer de mama mediado por progestina, en la termoregulación y finalmente en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2.

Indicaciones posibles

- Osteoporosis postmenopáusica y senil
- Osteoporosis inducida por glucocorticoides
- Enfermedad con actividad de resorción incrementada localmente
- Artritis
- Oncología
- Diabetes mellitus tipo 2

2) CONTENIDO DEL KIT

CONT	COMPONENTES DEL KIT	CANTIDAD
PLACA	Tiras con micropocillos recubiertas de OPG recombinante humana, incluidas en un soporte.	12 x 8 tests
WASHBUF	Tampón de lavado concentrado 20x, tapón transparente	1 x 50 ml
ASYBUF	Tampón de ensayo, tapón rojo, listo para usar	1 x 7 ml
AB	Anticuerpo de cabra policlonal biotinilado anti sRANKL, tapón verde, listo para usar.	1 x 22 ml
STD	Estándares (0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 pmol/l), tapón blanco.	7 viales liofilizados
CTRL	Controles A+B, OPG recombinante humana en suero humano, tapón amarillo. Consultar en la etiqueta la concentración exacta tras reconstitución.	2 viales liofilizados
CONJ	Conjugado, (estreptavidina-HRPO), tapón ámbar, listo para usar.	1 x 22 ml
SUB	Substrato (Solución de TMB), bote ambar y tapón azul, listo para usar.	1 x 22 ml
STOP	Solución de parada, tapón blanco, lista para usar.	1 x 7 ml

3) MATERIAL ADICIONAL INCLUIDO EN EL KIT

- 3 tiras adhesivas de plástico
- Protocolo QC
- Hoja con el esquema de la placa
- Manual de instrucciones

4) MATERIAL Y EQUIPAMIENTO NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

- Pipetas de precisión calibradas para dispensar 50 µl, 150 µl, 200 µl, 300 µl y puntas desechables
- Agua destilada o desionizada.
- Se recomienda lavador de placas para lavar, como alternativas pipetas multicanal o un dispensador.
- Frigorífico a 4°C (2-8°C).
- Lector ELISA para absorbancias de 450 nm (con longitud de ondas de corrección de 630 nm).
- Papel gráfico o software para el cálculo de resultados.

5) REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE MUESTRA

Todos los reactivos en el kit son estables a 4°C (2-8°C) hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta de cada reactivo.

Preparación de la muestra:

Recoger muestras de sangre venosa utilizando tubos de recogida de muestra estandarizados para suero o plasma heparinizado. Se recomienda centrifugar, parar separar el plasma o el suero, tan pronto como sea posible, ej: 10 min a 2000 x g preferiblemente a 4°C (2-8°C). Si esto no es posible almacene las muestras a 4°C (2-8°C) antes de la centrifugación (hasta un día). La muestra de suero o plasma recogida deberá ser medida tan pronto como sea posible. Para mantener las alícuotas almacenadas durante más tiempo se pueden congelar a -25°C o a temperaturas más bajas. Las muestras solo pueden someterse a un máximo de 3 ciclos de congelación-descongelación. Las muestras lipémicas o hemolizadas pueden dar resultados erróneos. Las muestras deberán ser mezcladas correctamente antes de cada ensayo. Se recomienda realizar las muestras por duplicado. Si en la lectura de las muestras se manifiestan valores superiores al tope estándar establecido recomendamos que se diluyan con muestras de suero de baja concentración y que se vuelvan a medir.

Para información adicional sobre la estabilidad de las muestras por favor visite nuestra página web www.bmgrp.com (ver ficheros técnicos "Technical Files") o contacte con nuestro servicio de atención al cliente por e-mail export@bmgrp.com o por teléfono +43/1/29107-45.

Reconstitución/ Manipulación:

STD (Estándares) y CTRL (Controles): Pipetear 700 µl de agua destilada o desionizada en cada vial. Dejar a temperatura ambiente (18-24°C) durante 15 min. Los estándares y controles reconstituidos son estables a -25°C hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta, evitar ciclos de congelación y descongelación.

WASHBUF (Tampón de lavado): Diluir el concentrado 1:20, ej. 50 ml WASHBUF + 950 ml de agua destilada. Los cristales en el tampón concentrado pueden disolverse a temperatura ambiente. El tampón sin diluir es estable a 4°C (2-8°C) hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta. Si el WASHBUF está diluido, se mantiene estable durante un periodo de un mes, como máximo, a 4°C (2-8°C). Emplear solo el WASHBUF (tampón de lavado) diluido para el ensayo.

6) PRINCIPIO DEL ENSAYO

Ver capítulo 6) PRINCIPLE OF THE ASSAY de la versión inglesa del manual de instrucciones del ensayo.

7) PROTOCOLO DEL ENSAYO

Todos los reactivos y las muestras deben estar a temperatura ambiente (18-24°C) antes de utilizarse en el ensayo.
Marcar la posición de BLANCO/STD/MUES/CTRL (Blanco/Estándar/Muestra/Control) en la hoja del protocolo.
Sacar las tiras con los pocillos de la bolsa de aluminio, y emplear como mínimo un pocillo para el blanco. Almacenar las tiras no utilizadas en la bolsa de aluminio con desecante a 4°C (2-8°C). Las tiras son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

1.	Realizar un **prelavado de los pocillos** con 300 µl del tampón de lavado diluido (WASHBUF, tapón transparente) 5 veces. Eliminar el tampón de lavado sobrante golpeando suavemente la placa sobre papel absorbente después del último lavado.
2.	Añadir 50 µl del tampón de ensayo (tapón rojo) en cada pocillo. Añadir 150 µl del tampón de ensayo en el pocillo para el blanco.
3.	Añadir 150 µl de STD/MUES/CTRL (Estándar/Muestra/Control) por duplicado en sus respectivos pocillos, excepto para el blanco.
4.	**Tapar con cuidado con las hojas adhesivas e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente (18-24°C).**
5.	Aspirar y lavar los pocillos 5 veces con 300 µl del tampón de lavado diluido (WASHBUF, tapón transparente). Eliminar el tampón de lavado sobrante golpeando suavemente la placa sobre papel absorbente después del último lavado.

6.	Añadir 200 µl del anticuerpo anti-sRANKL biotinilado (AB, tapón verde) a cada pocillo, excepto para el blanco. Agitar suavemente. Añadir 150 µl del ASYBUF (tampón de ensayo, tapón rojo) en el pocillo para el blanco.
7.	**Tapar con cuidado con las hojas adhesivas e incubar durante la noche (18-24 horas) a 4°C (2-8°C).**
8.	Aspirar y lavar los pocillos 5 veces con 300 µl del buffer de lavado diluido (WASHBUF, tapón transparente). Eliminar el tampón de lavado sobrante golpeando suavemente la placa sobre papel absorbente después del último lavado.
9.	Añadir 200 µl de conjugado (CONJ, tapón ámbar) a cada pocillo.
10.	**Tapar con cuidado con las hojas adhesivas e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente (18-24°C) en la oscuridad.**
11.	Aspirar y lavar los pocillos 5 veces con 300 µl del buffer de lavado diluido (WASHBUF, tapón transparente). Eliminar el tampón de lavado sobrante golpeando suavemente la placa sobre papel absorbente después del último lavado.
12.	Añadir 200 µl de substrato (SUB, tapón azul) a cada pocillo.
13.	**Incubar durante media hora a temperatura ambiente (18-24°C) en la oscuridad.**
14.	Añadir 50 µl de la solución de parada (STOP, tapón blanco) a cada pocillo.
15.	Medir la absorbancia inmediatamente a 450 nm y si fuera posible con un filtro de referencia de 630 nm.

8) CÁLCULO DE RESULTADOS

Leer la densidad óptica (OD) de todos los pocillos en un lector de placas usando la longitud de onda de 450 nm (longitud de onda de corrección de 630 nm). Substraer la densidad óptica OD del blanco de todos los valores de la densidad óptica de los estándares, controles y muestras. Construir la curva estándar a partir de la densidad óptica de los estándares. Utilizar un software comercialmente disponible o un papel gráfico. Calcular la concentración de las muestras a partir de esta curva estándar. El ensayo se ha evaluado con el algoritmo 4PL. Se recomienda al usuario que evalúe diferentes métodos de ajuste de curvas.

Curva estándar típica:
Ver capítulo 8) CALCULATIONS OF RESULTS de la versión inglesa del manual de instrucciones del ensayo.

El certificado del control de calidad que se suministra con el kit muestra los resultados del control de calidad final que se realiza con cada lote. Los datos de la densidad óptica obtenidos por los clientes pueden diferir debido a diversos factores y/o debido a una disminución obvia de la intensidad de la señal a lo largo de la vida media del producto. Sin embargo, esto no afecta a la validez de los resultados siempre que se obtenga, como mínimo, un valor de 1,5 para la densidad óptica del estándar de concentración más elevada y los controles estén dentro de su rango de medida (para ver los rangos de los controles ver las etiquetas de sus viales).

9) CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Valores de individuos aparentemente sanos:	Mediana (suero n=32): 0,14 pmol/l. Cada laboratoro debería establecer sus propios rangos de referencia para las muestras que van a ser examinadas. No cambiar el tipo de muestras durante el estudio.
Rango de los estándares:	0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 pmol/l.
Factor de conversion de pg/ml a pmol/l:	1 pg/ml = 0,05 pmol/l (MW: 20 kD, monomero)
Volumen de la muestra:	150 µl de suero humano o de plasma heparinizado.
Límite de detección /LLoQ:	(0 pmol/l + 3 SD): 0,01 pmol/l / 0,008 pmol/l
Tiempo de Incubación:	2 horas / 18-24 horas / 1 hora / 30 min

Para más información sobre las características del ensayo visite, por favor, nuestra página web www.bmgrp.com (ver ficheros técnicos “Technical Files”) o contacte con nuestro servicio de atención al cliente por e-mail export@bmgrp.com o por teléfono +43/1/29107-45.

10) PRECISIÓN

Intra-ensayo: un operador analizó 5 veces 2 muestras de concentraciones conocidas con un mismo kit.
Inter-ensayo: 3 operadores analizaron 12 veces 2 muestras de concentraciones conocidas con 3 kits distintos.

Intra-ensayo (n=5)	Muestra 1	Muestra 2	Inter-ensayo (n=12)	Muestra 1	Muestra 2
Media (pmol/l)	0,12	1,00	Media (pmol/l)	0,12	1,00
SD (pmol/l)	0,005	0,04	SD (pmol/l)	0,004	0,02
CV (%)	4	4	CV (%)	3	2

Para más detalles sobre los datos de validación y de las características visite, por favor, nuestra página web: www.bmgrp.com (ver ficheros técnicos "Technical Files"), o contactar con nuestro servicio de atención al cliente por e-mail: export@bmgrp.com o por teléfono: +43/ 1/ 29107-45.

11) OBSERVACIONES TÉCNICAS

- No mezclar ni sustituir reactivos procedentes de diferentes lotes o fabricantes.
- No mezclar tapas y tapones de los viales de diferentes reactivos o de reactivos de diferentes lotes.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.
- Proteger los reactivos de la acción directa de la luz solar.
- Las soluciones de substrato deberían mantenerse incoloras hasta que se añadan a la microplaca.
- Para asegurar unos resultados más exactos, es necesario tapar adecuadamente la placa con el papel adhesivo durante los pasos de incubación.
- Evitar la formación de espuma al mezclar los reactivos.

12) PRECAUCIONES

Todos los componentes de procedencia humana fueron testados para dectectar la presencia de anticuerpos de VIH y Hepatitis B; el resultado fue negativo. Sin embargo, deberían manipularse y deshechar como si se tratara de material potencialmente infeccioso. Todos los reactivos líquidos contienen Proclina 300 al 0,01% como conservante. Evitar el contacto con la piel o con las membranas mucosas. La Proclina 300 no es tóxica en las concentraciones empleadas en este kit. Como puede provocar reacciones alérgicas en la piel, evitar el contacto con la piel o los ojos.

- No pipetear con la boca.
- No comer o beber o aplicarse cosméticos en las zonas de manipulación de los reactivos.
- Evitar el contacto con los reactivos utilizando guantes.
- La solución de parada contiene ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es irritante para los ojos y la piel. Enjuagar con abundante agua si se produce contacto. Evitar el contacto con la piel y con las membranas mucosas. Puede presentarse irritación. Si tiene lugar contacto alguno, enjuagar con abundante agua.

13) LITERATURA

Ver capítulo 13) LITERATURE de la versión inglesa del manual de instrucciones del ensayo.

SYMBOLS



Expiry date / Verfallsdatum / Date de péremption / Data di scadenza /Fecha de caducidad / Data de validade / Uiterste gebruiksdatum / Udløbsdato / Utgångsdatum / Termin Ważności / Lejárati idő / Doba exspirácie / Doba exspirace



Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización / Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję wykonania / Vegyük figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití

IVD

In vitro Diagnostic Medical Device (for in Vitro Diagnostic Use)/ In vitro Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik) / Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro) / Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro) / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro) / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro (Para utilização de diagnóstico "in vitro") / Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (Voor diagnostisch gebruik in vitro) / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse) / Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (För in vitro-diagnostiskt bruk) / Wyrób medyczny do Diagnostyki In Vitro / In vitro orvosdiagnosztikai termék / In vitro diagnostický zdravotnícky materiál (určené pre diagnostiku „in vitro") / In vitro diagnostický zdravotnicky materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro")

LOT

Lot-Batch Number / Charge-Chargennummer / Lot-Code du lot / Lotto-Numero di lotto / Lote-Código de lote / Lote-Código do lote / Lot-Partijnummer / Lot-Batchkode / Lot-Satskod / Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže



Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tillverkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta / Vyrobené / Vyrobeno

REF

Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenummer / Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalogové číslo



Store at between / Lagerung bei zwischen / Conserver à entre / Conservare a tra / Conservar a temp. entre / Armazene a entre / Bewaar bij tussen / Opbevares mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk …… között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí



Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenuto sufficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém suficiente para x testes / Bevat voldoende voor x bepalingen / Indeholder tilstrækkeligt til x prøver / Innehållet räcker till x analyser / Zawartość na x testów / Tartalma X teszt elvégzésére elegendő / Obsahuje materiál pre x testov / Obsahuje materiál pro x testů

<u>Authorized Representative for Registration:</u>

mdi Europa GmbH
Langenhagener Str. 71
D-30855 Hannover-Langenhagen

BI-20462 FREE Soluble RANKL HS ELISA

ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST

PREPARATION OF REAGENTS:

- ❑ Bring all reagents to room temperature (18-24°C).
- ❑ Prepare reagents and samples as instructed.
- ❑ Bring unused and prepared components to the storage temperature mentioned in the package insert.
- ❑ Take microtiter strips out of the alu bag and mark positions on the protocol sheet.

- ❑ 1. **Prewash wells** with 300 µl diluted WASHBUF (wash buffer, natural cap) five times. Remove remaining WASHBUF by tapping plate against paper towel after the last wash.
- ❑ 2. Add 50 µl ASYBUF (assay buffer, red cap) into each well. Pipette additional 150 µl ASYBUF into well marked as blank.
- ❑ 3. Add 150 µl STD/SAMPLE/CTRL (standard/sample/control) into all wells except blank.
- ❑ 4. **Cover tightly and incubate at room temperature (18-24°C) for 2 hours.**
- ❑ 5. Aspirate and wash wells with 300 µl diluted WASHBUF (wash buffer, natural cap) five times. Remove remaining buffer by tapping plate against paper towel.
- ❑ 6. Add 200 µl AB (biotinylated anti sRANKL antibody, green cap) into each well, except blank. Swirl gently. Pipette additional 200 µl ASYBUF (assay buffer, red cap) into well marked as blank.
- ❑ **7. Cover tightly and incubate at 4°C (2-8°C) over night (18-24 hours).**
- ❑ 8. Aspirate and wash wells with 300 µl WASHBUF (wash buffer, natural cap) five times. Remove remaining buffer by tapping plate against paper towel.
- ❑ 9. Add 200 µl CONJ (conjugate, amber cap) into each well.
- ❑ **10. Cover tightly and incubate at room temperature (18-24°C) for 1 hour in the dark.**
- ❑ 11. Aspirate and wash wells with 300 µl WASHBUF (wash buffer, natural cap) five times. Remove remaining buffer by hitting plate against paper towel.
- ❑ 12. Add 200 µl SUB (substrate, blue cap) into each well.
- ❑ **13. Incubate at room temperature (18-24°C) for 30 minutes in the dark.**
- ❑ 14. Add 50 µl STOP (stop solution, white cap) into each well.
- ❑ 15. Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.